



TITLE:

骨格筋のZ膜に存在する新しい調節蛋白質の研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

大橋, 一世

CITATION:

大橋, 一世. 骨格筋のZ膜に存在する新しい調節蛋白質の研究. 京都大学, 1979, 理学博士

ISSUE DATE:

1979-03-23

URL:

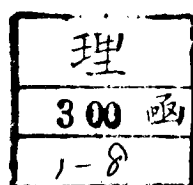
<https://doi.org/10.14989/doctor.k2166>

RIGHT:

骨格筋の区膜に存在する
新しい調節蛋白質の研究

大橋一世

区膜に存在する新しい
調節蛋白質の研究



大橋一世

目 次

序	1
材料と方法	4
1 豆膜に存在する新しい 蛋白質の粗調製	4
2 SDS ホリアクリルアミ ド電気泳動法	5
3 等電点電気泳動法	5
4 抗血清の調製	6
5 免疫拡散法および免疫 電気泳動法	6
6 筋原線維の調製	7
7 蛍光抗体法	8
8 蛋白濃度の決定	9
9 アクチンと画分Iの結 合実験	9

結果

1. DEAE-cellulose カラム クロマトグラフィーによる
 膜に存在する新しい
 蛋白質の精製 10
2. 精製した新しい蛋白質
 の性質 13
 - 1) 画分 I の紫外線吸収曲線 13
 - 2) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量の測定 13
 - 3) アミノ酸分析 16
 - 4) 画分 I は単一蛋白質ではない 16
3. 免疫拡散法 免疫電気泳動法による抗体の特異性の検討 19

4、	蛍光抗体法で画分Ⅰの 蛋白質の存在位置を調 べる	24
5	画分Ⅰは、 α アクチニ ン・デスミンではない	27
1)	分子量による比較	27
2)	α アクチニンに対する 抗体を作って免疫的差 異を示す	30
3)	抗画分Ⅰ抗体はデスミ ンと反応しない	30
4)	抗画分Ⅰ抗体はデスミ ンで吸収されない	32
6	アクチンとの結合実験	32

考察

1、	画分Ⅰはアイソプロテ インか	36
----	-------------------	----

2、画分Ⅰの溶液中での存在状態	37
3 画分Ⅰは、低イオン強度で冷室に保存すると沈殿を作る	38
4、画分Ⅰのアミノ酸組成について	40
5、画分Ⅰは新しい蛋白質である	41
6、新しい蛋白質の存在位置について	42
7、新しい蛋白質の収量について	43

要約	46
----	----

謝辞	48
----	----

参考文献	49
------	----

序

脊椎動物の骨格筋が横紋構造を持つことは古くから知られている。位相差顕微鏡で観察すると高屈折率のA帯と中央に高屈折率のZ帯を持つ低屈折率のI帯の繰り返しであることがわかる。H. E. Huxley と J. Hanson は干渉顕微鏡による観察と生化学的研究とからA帯にはミオシン、I帯にはアクチンが主として存在することを示した。⁽¹⁾⁽²⁾ また電子顕微鏡による微細構造の研究から、骨格筋の収縮は、アクチンフィラメントがミオシンフィラメントにすべり込むことによるとする滑り説を提唱した。⁽³⁾ 一方、A. F. Huxley はアクチンフィラメントの滑り込みはミオシン分子の首ふり運動によるミオシンとアクチンの相互作用によって起るとする首ふり運動説を唱え⁽⁴⁾ 今日では広く受け入れられている。

江橋らは、筋収縮の基礎となるアクチンとミオシンの相互作用はカルシウムイオンによ

って調節されていることを発見し⁽⁵⁾ それを仲介する蛋白質を調製した。⁽⁶⁾ このトロポニンの発見が調節蛋白質研究の発端である。

アクチンフィラメントに結合し、アクチンとミオシンの相互作用を直接制御するトロポニンとトロポミオシンは比較的多量に含まれており（筋原線維の約5%⁽⁷⁾）詳細に研究されている。

筋原線維としての構造を組み立てる上で、役割をはたし、間接的にアクチン・ミオシンの相互作用を調節する蛋白質がいくつか報告されているが、筋肉の弾性要素であるコネクチン（筋原線維の約5%⁽⁷⁾）を例外として、いずれも少量しか含まれていない。

ミオシンフィラメントに存在するものとしてはMタンパク質⁽⁸⁾、Cタンパク質⁽⁹⁾、Iタンパク質⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾があり、アクチンフィラメントに存在するものとして、 β アクチニン⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾、 γ アクチニン⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾がある。

Z膜の微細構造は G. G. Knappies と F. Carlsen

以来 電子顕微鏡の超薄切片法により、詳細に研究されて来た。⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾ しかし、その構成成分としては、 α アクチニンが知られているだけであった。⁽²¹⁾⁽²²⁾ 最近 Lazarides⁽²³⁾ らは、100 Å フィラメントを構成するデスミンがZ膜に存在することを示した。また α アクチニンと共に抽出される分子量 43,000 の 10 S アクチニンは長らく、変性アクチンではないかという疑いを持たれていたが 黒田らによつてZ膜の構成成分であることが示された。⁽²³⁾⁽²⁴⁾ 他に、心臓タイプのクレアチンキナーゼがZ膜と結合することが報告されているが、⁽²⁵⁾ 骨格筋タイプのクレアチンキナーゼはM帯に存在している。⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾

本論文では、骨格筋の新しい蛋白成分の調製法と性質について述べ、蛍光抗体法によりZ膜に存在することを示す。この蛋白質の特徴はガラス器内で格子構造を取ることであり、他に例を見ない。Z膜の格子構造との類似性が注目される。

材料と方法

1. 2膜に存在する新しい蛋白質の粗調整
ニワトリの胸筋を原材料とする。主として
 β アクチニン Iタンパク質の調製法に従っ
て行う。⁽¹³⁾⁽¹⁰⁾ 1 kg の筋肉を 1 mM NaHCO_3 0.05 M KCl
5 mM EGTA 溶液中で粉碎し、よく洗い筋原線
維を取り出して、Hasselbach-Schneider の溶液で 2 時
間づつ 5 回抽出する。残渣をガラス蒸留水で
よく洗い、0.6 M KI 溶液で 2 回抽出する。1
回目は氷中で 20 分間抽出し、主としてアクチ
ンを除く。2 回目は 4°C で 24 時間抽出する。
3 回目の抽出液を 1 mM NaHCO_3 に対して透析し
硫酸分画する。20-40% 飽和で沈殿する画分
を集める。これを 1 mM NaHCO_3 に透析し遠
心 (50,000 rpm) した上清が粗精製蛋白溶液であ
る。収量は約 20 ~ 30 mg である。次に DEAE-
cellulose カラムクロマトグラフィーを行い純化
する。(結果 1 参照)

え SDS ホリ ア ク リ ル ア ミ ド 電 気 泳 動 法

10 % ア ク リ ル ア ミ ド ゲ ル を 用 い る 。 基 本 的
に は Weber と Osborn の 方 法 に 従 っ て 行 な っ
た。⁽³²⁾

3 等電点電気泳動

尿素を含む系での等電点電気泳動は O'Farrell
の 方 法⁽³³⁾ を 少 し 変 更 し て 行 な っ た 。 8.5 M 尿 素
、 2 % Triton X-100 、 2 % ア ン フ ェ ラ イ ン (pH
範 囲 3.5 - 10) を 含 む 4 % ア ク リ ル ア ミ ド ゲ ル
を 用 い る 。 電 極 液 は + 側 が 0.01 M H_3PO_4 、 - 側
が 1 % NaOH で サ ン プ ル は + 側 に 添 加 す る 。
通 電 は 、 200 V / 時 間 、 500 V で 18 時 間
600 V で 2 時 間 行 う 。 (ゲ ル 長 13 cm の 時)

尿素を含まない系での等電点電気泳動は、
上 記 ゲ ル の 組 成 か ら 尿 素 と Triton X-100 を 除 い
て 用 い る 。 通 電 時 間 は 200 V / 時 間 、 500 V
9 時 間 、 600 V / 時 間 で あ る 。 他 は 尿 素 を 含
む 系 に 準 じ て 行 っ た 。

4 抗血清の調製

DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー
で精製した抗原(図2(2))を 0.3 mg, Freund の
コンプリートアジュバントと共にウサギの足
底および背中に注射する。3週間後に 抗原
0.3 mg を Freund のインコンプリートアジュバ
ントと共に 背中に注射。さらに2週間後
同じ操作で抗原 0.1 mg を注射, その10日後,
耳静脈より採血する。定法に従って血清成分
を分離し, 抗血清とする。

5 免疫拡散法および免疫電気泳動法

50 mM のバルビタール緩衝液 (pH 8.3) にと
かした 1% アガロースをスライドグラス上に
3 ml ほどそそぎ, ゲル化させて使用する。電気泳
動時の緩衝液は 50 mM バルビタール緩衝液 (pH 8.3) である。電気泳動を SDS ポリアクリル
アミドゲルで行う場合は前記(材料と方法2)
の方法に従い, 泳動後ゲルをスライドグラス
上に乗せ 0.3% Triton X-100 を含む 50 mM のバ

ルビタール緩衝液 (pH 8.3) にとかした 1% アカロースをそそぎゲル化させ免疫拡散を行う。電気泳動を等電点電気泳動法 (材料と方法 3) による場合は、泳動後 15 分位蒸留水中にアクリルアミドゲルを浸し、できるだけ尿素を取り除いてから スライドガラス上に移す。次に 50 ml バルビタール緩衝液にとかした 1% アカロースで包埋し、ゲル化した後免疫拡散を行う。

抗原抗体反応は、室温で 24 時間行う。

6 筋原線維の調製

ニワトリの脳筋を約 1.2 倍に引きのばしガラス棒に固定して、50% グリセリン 0.05 M KCl, 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 5 mM EGTA 溶液中に -20°C で 1 ヶ月以上貯える。これを 0.15 M NaCl, 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2), 10 mM EGTA 中で、ワーリングブレンダーを用いて粉碎し筋原線維標品とした。

7. 蛍光抗体法

直接法と間接法で行い同一結果を得た。本論文には間接法の結果を示してある。間接法の手順を次に示す。筋原線維を生理食塩水で60倍に希釈した抗血清と室温で30分間反応させる。生理食塩水でよく洗ってから、生理食塩水で60倍に希釈した FITC で標識した抗ウサギ Ig G 羊抗体 (Miles-Yada LTD) を加え室温で30分間反応させる。生理食塩水でよく洗滌し、位相差・落射蛍光顕微鏡で観察する。上記の操作は全てスライドグラス上で、溶液をカバーグラスの一端より加え反対側から口紙で吸収することにより行った。

吸収実験の方法を次に記す。抗血清に吸収に用いる蛋白質を加え生理食塩水で60倍希釈になるように調節する。加える蛋白質量は最終濃度が 0.2 mg/ml 以上になるようにする。

この処理血清を用いて間接蛍光抗体法を行い吸収の有無を調べる。

8 蛋白濃度の決定

ビュレット法と 280 nm の紫外線吸収値の測定とを併用した。

9 アクチンと画分 I の結合実験

0.1 M KCl , $\text{pH} 7.2$, 20 mM リン酸緩衝液中で 0.7 mg/ml の F アクチンと 0.02 mg/ml の画分 I を混合し室温で 30 分間放置してから $50,000\text{ rpm}$ で 1 時間超遠心する。上清と沈殿を SDS ポリアクリルアミド電気泳動で調べる

10、 α アクチニンの抗体の調製

江橋らの方法に従って⁽²¹⁾ 抽出した α アクチニンを含む画分を DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーで精製し、免疫原として用いる。材料と方法 4 に従って抗体を調製する。

11 デスミンの調製

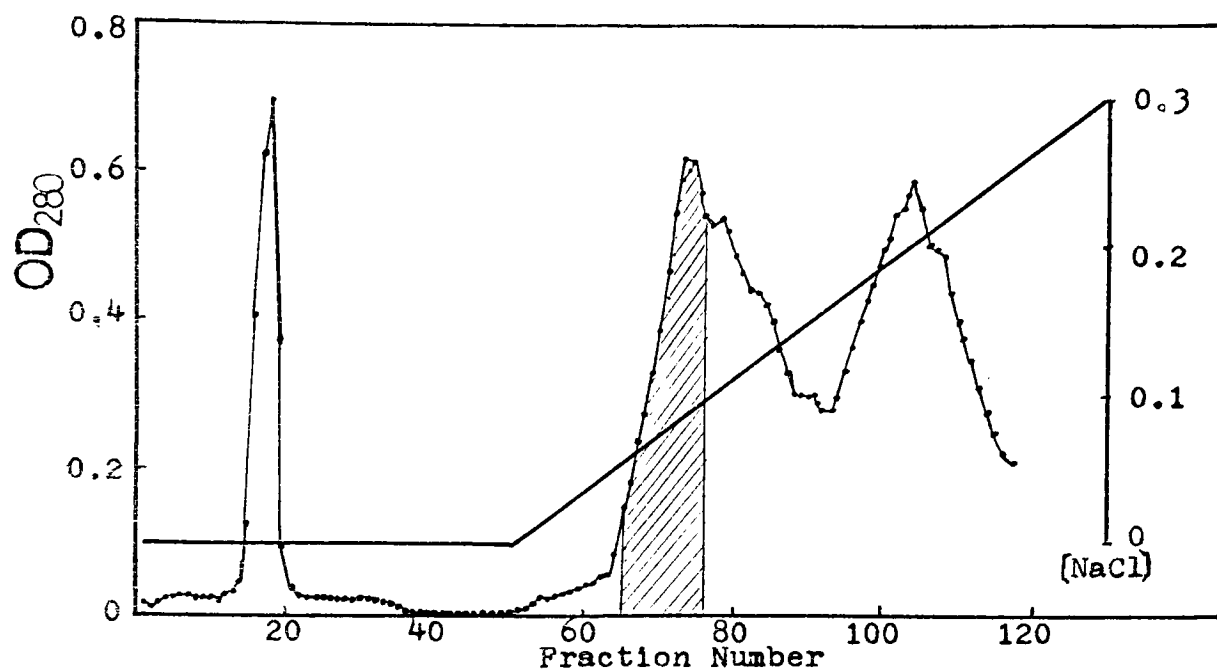
Small らの方法に従って⁽²⁹⁾ 調製した。不純物が含まれているが、デスミンが得られた。

結 果

1. DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー による 豆膜に存在する新しい蛋白質の 精製

粗精製蛋白質 (材料と方法 1. 参照 図 2)
約 100 mg を 20 mM の Tris-HCl 緩衝液 pH 7.5
に対して透析する。これを あらかじめ上記
緩衝液で平衡化した直径 26 mm 長さ 10 cm の
DEAE-cellulose カラムに添加し 20 mM の Tris-
HCl 緩衝液 (pH 7.5) 150 ml と 20 mM Tris-HCl
pH 7.5 を含む 0.3 M NaCl 150 ml で作られた濃
度勾配溶液により溶出させる。図 1. (1) に示す
ように新しい蛋白質は NaCl の濃度が約 0.1 M
になるまでに溶出される (図 2 の)。斜線で示
す部分 (図 1 (1)) を集め 再度同じカラムで
カラムクロマトグラフィーを行う。今回は
濃度勾配を 80 ml の 40 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH
7.5) と 80 ml の 40 mM Tris-HCl (pH 7.5) 0.15 M
NaCl 溶液で作る。溶出の様子を図 1 (2) に示す。

(1)



(2)

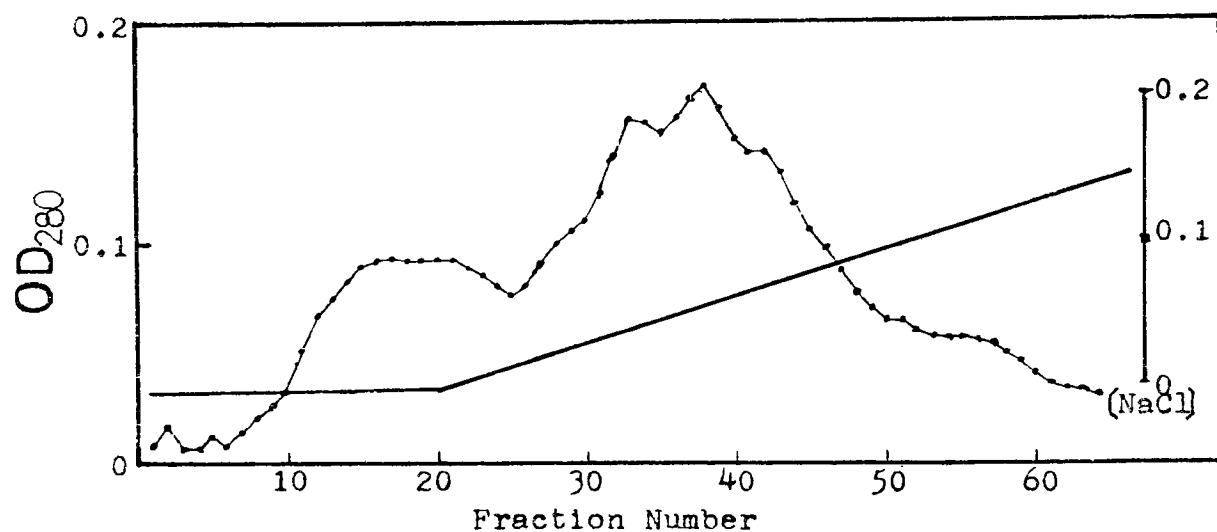


図 1 (1), DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーによる粗精製蛋白質の溶出パターン
(2) (1) の斜線の部分の蛋白質の DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーによる溶出パターン

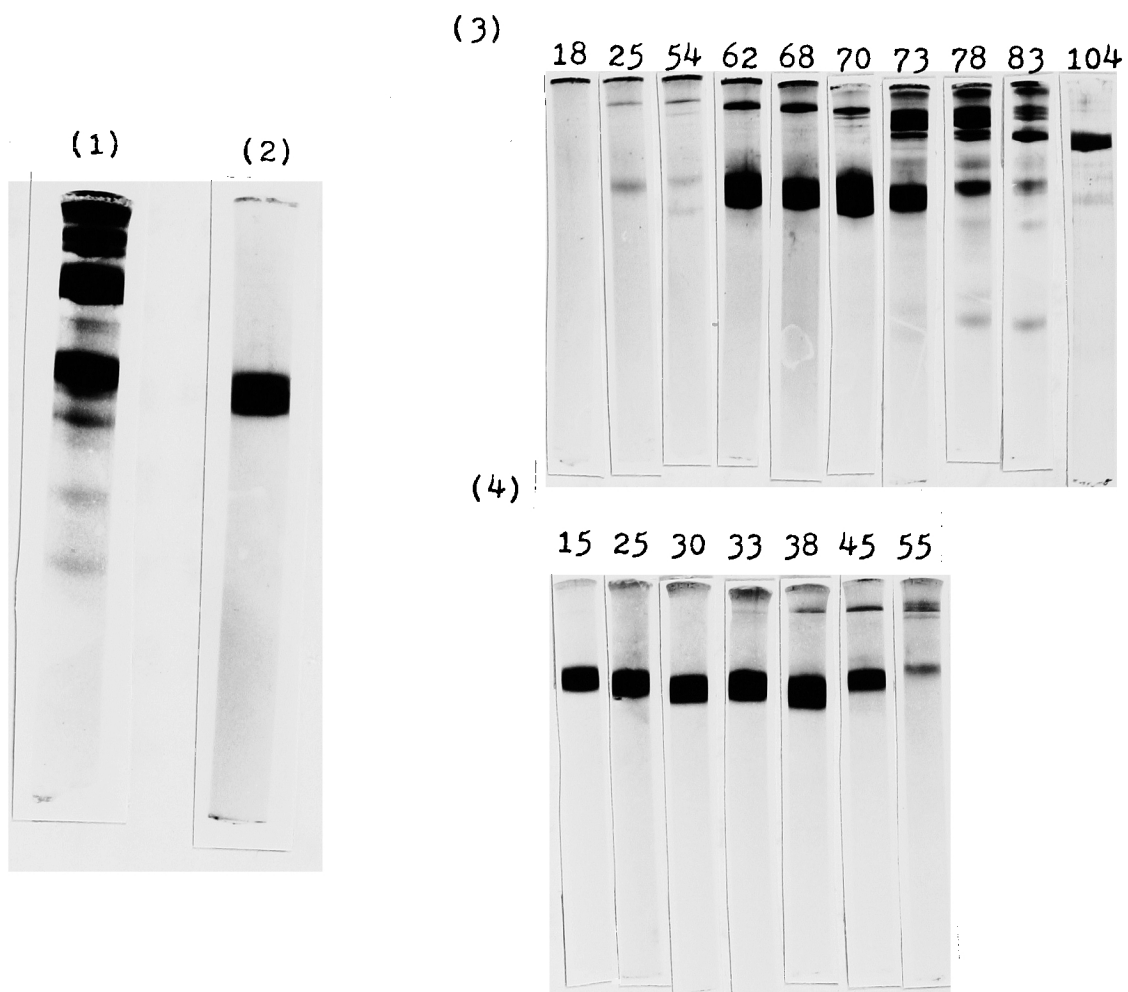


図2 (1) 粗精製蛋白質 / 回目 DEAE-cellulose
 カラムクロマトグラフィーの発物である。
 (2) DEAE-cellulose の再カラムクロマトグラフィー
 による純化した分子量 55,000 の蛋白質
 (3) 1 回目 DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー
 の溶出パターン (4) 再 DEAE-cellulose カラムク
 ロマトグラフィーの溶出パターン ゲル
 の上の番号は分画番号をあらわす。図1を
 参照。

画分番号 15 から 25 までは溶出された蛋白質を画分 I , 26 から 45 までは溶出されたものを画分 II と以後呼ぶことにする。 SDS ホリアクリルアミド電気泳動法によると (図 2) 画分 I は ほぼ純粋な画分で , 画分 II は分子量が 14 ~ 15 万程度の不純物を少し含んでいる。これ等 α 画分をそれぞれコロジオンバックで濃縮し 1 mM NaHCO_3 に対して透析後 50,000 rpm で超遠心し上清を集める。収量は画分 I が約 5 mg 画分 II が約 15 mg である。

2. 精製した新しい蛋白質の性質

1) 画分 I の紫外線吸収曲線

画分 I は 278 nm にピークを持つ展形的なタンパク質の紫外線吸収曲線を示す (図 3)
ビュレット反応により測定した蛋白濃度と OD_{280} の吸収と α 対応関係を表 I に示す。吸光係数はおよそ $E_{1\%}^{1\text{cm}}(280) = 4.2$ である。

2) SDS ホリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量の測定

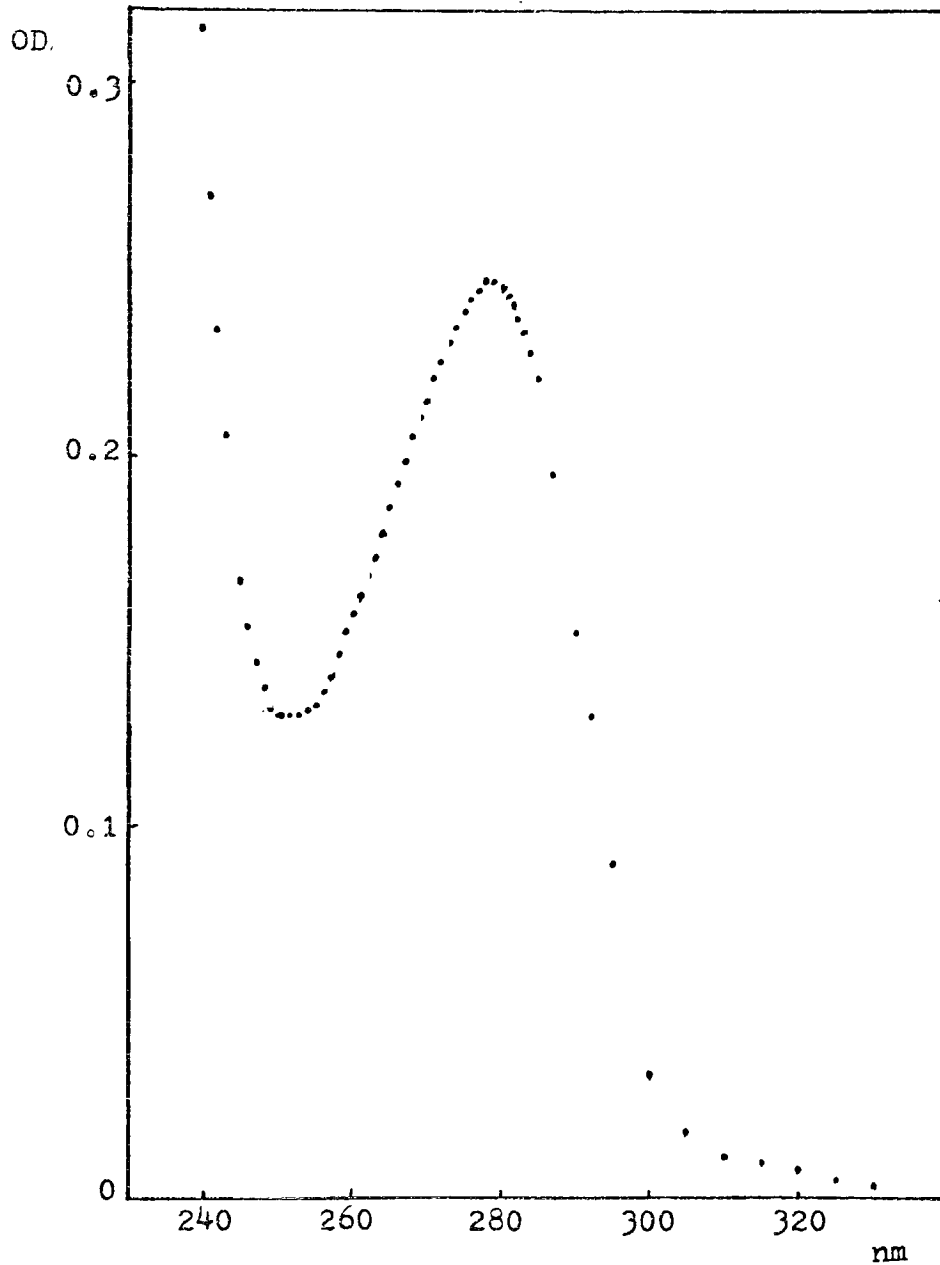


図3 画分Iの紫外線吸収曲線 この時、ビュレット法による蛋白濃度は 0.53 mg/ml である。

biuret _(mg/ml)	OD ₂₈₀	$E_{1\text{cm}(280)}^{1\%}$
0.98	0.39	4.0
0.53	0.25	4.5
0.70	0.29	4.1

表Ⅰ ビュレット法による蛋白濃度と280nmの紫外部吸収値との比較 $E_{1\text{cm}(280)}^{1\%}$ は吸光係数である。

10% のホリアクリルアミドのシリンドーゲルで画分Iをマーカー蛋白質と共に泳動しそれぞれの移動度を分子量の対数目盛に対してプロットした。(図4) マーカーには、アルブミン、アクチン、オブアルブミン、キモトリプシノーゲンA、ミオグロビン、チトクロムCを用いた。分子量はそれぞれ67,000、43,000、25,000、17,800、12,500である。図4より画分Iの分子量はおよそ55,000であると推定できる。

3) アミノ酸分析

画分Iのアミノ酸組成を表IIに示す。デスミンのアミノ酸組成²⁹⁾と比較して、Glu・Alaが少なくPhe・Proが多い。吸光係数から考えてチロシン・トリプトファンが少ないと思われるが、アミノ酸組成からはチロシンが特に少ないとはいえない。トリプトファンに関しては考察で触れる。アミノ酸組成の特徴はロイシン残基がかなり多いことである。

4) 画分Iは単一蛋白質ではない

10% の SDS ホリアクリルアミド電気泳動に

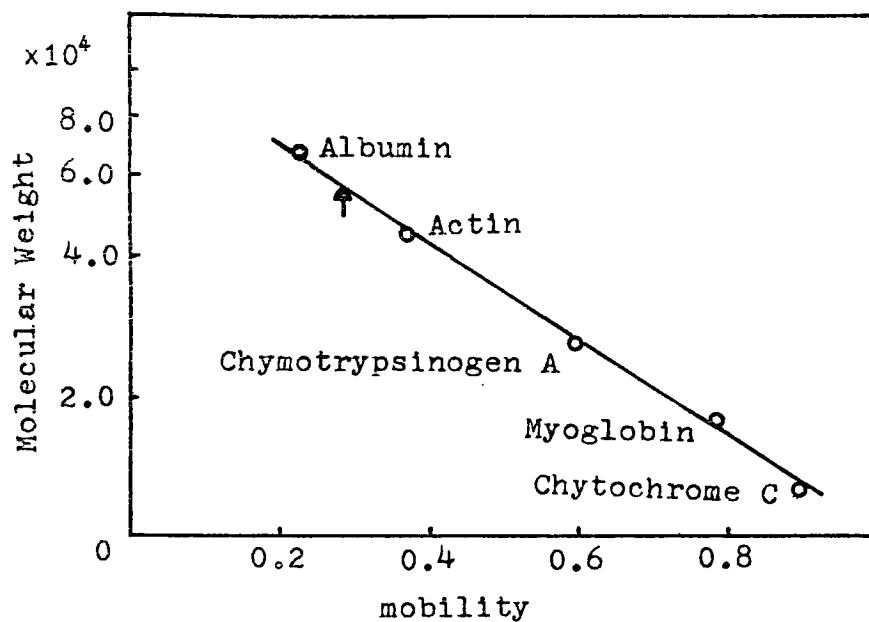


図4 SDS ポリアクリルアミド電気泳動による画分Iの分子量の測定 移動度は R_f 値で表わす。矢印は画分Iの泳動される位置である。

	Fraction I	Desmin (29)
Asp	102	88
Thr	51	57
Ser	57	74
Glu	116	197
Pro	58	23
Gly	63	60
Ala	49	86
Cys/2	5	5
Val	55	50
Met	19	25
Ile	64	42
Leu	117	99
Tyr	37	30
Phe	52	27
Lys	76	47
His	23	16
Arg	56	87

表 II 画分 I と デ ス ミ ンの ア ミ ノ 酸 組 成 の
 比較 表の ア ミ ノ 酸 残 基 数 は ア ミ ノ 酸 残
 基 1,000 個 あ た り の 個 数 で あ る 。

よって得られたバンドを拡大してみると 少なくとも 3 本に分かれているのがわかる。(図 5)

8.5 M 尿素を含む系で、pH 3.5 - pH 10 の等電点電気泳動を行うと 4 本の濃いバンドに分離する。(図 6 (a)) 等電点は pH 6.0 ~ pH 6.5 の間である。尿素を含まない系では 2 本の濃いバンドと、数本のバンドが集まった 1 つの箇所(矢印)がある。(図 6 (b))

3 免疫拡散法 免疫電気泳動法による 抗体の特異性の検討

画分 I をウサギに注射して得た抗血清は画分 I と画分 II に対する免疫拡散では同じ沈降線のパターンを示す。2~3 本の沈降線が観察される。(図 7)

画分 I に対する免疫電気泳動法でもやはり 2~3 本の沈降線が観察される。(図 8)

免疫拡散を 0.1% SDS , 2 ml βメルカプト
イタノールを含むアガロースゲル中で行う。

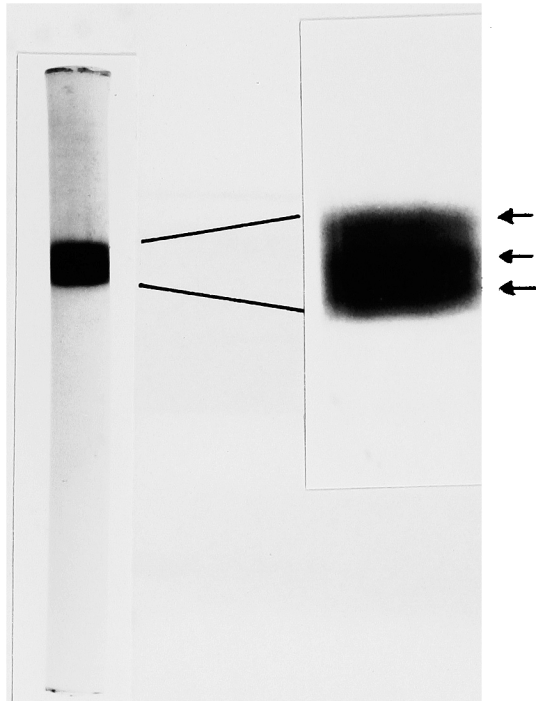


図 5 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動
による画分 I のバンドの拡大 3本の線が
見える。(矢印)

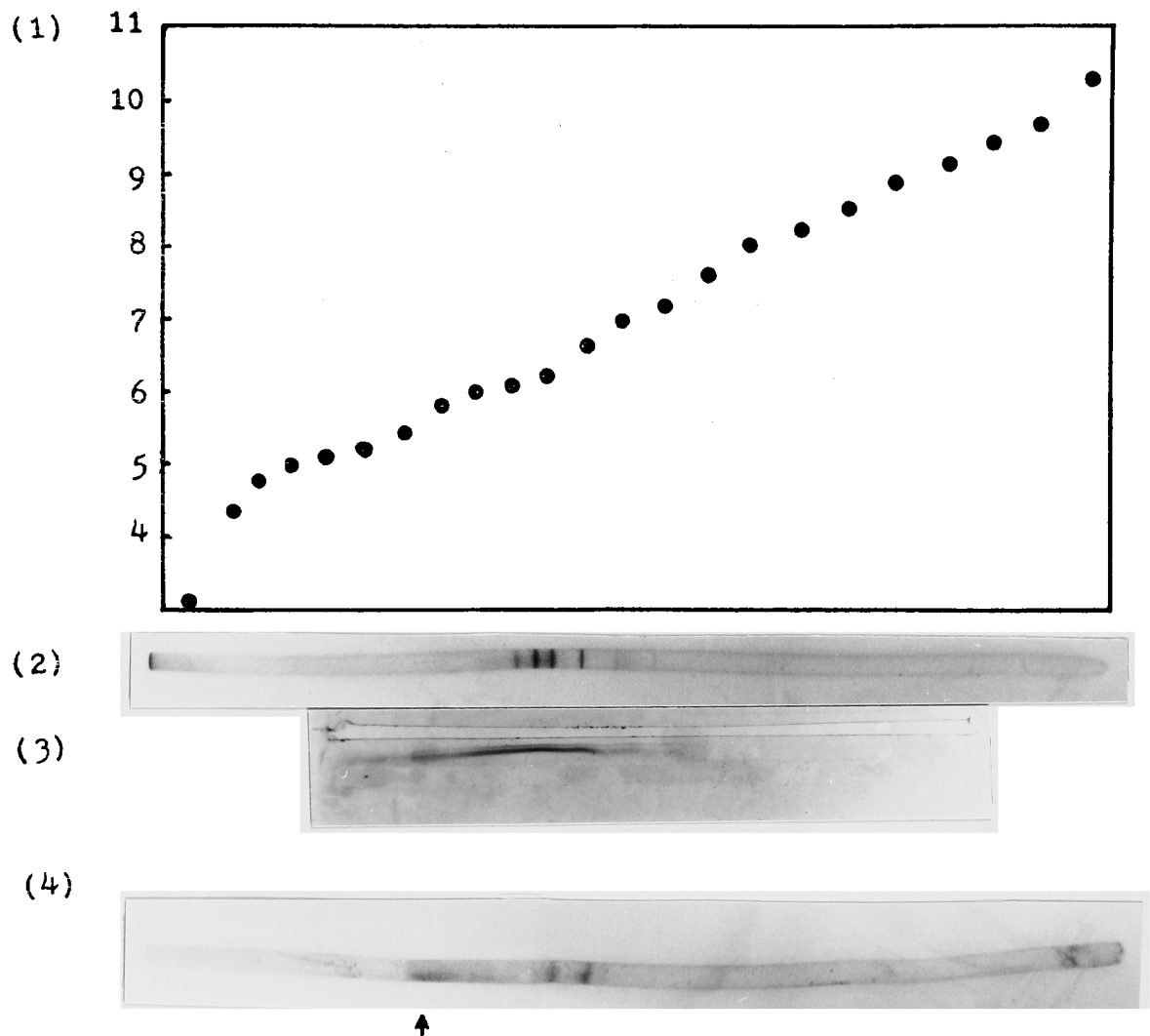
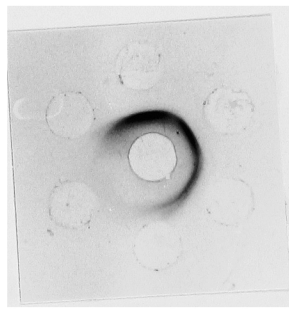


図6 画分Iの等電点電気泳動

(1) 尿素を含む系での等電点電気泳動の勾配
 (2) 尿素を含む系での等電点電気泳動のパターン
 (3) 尿素を含む系で泳動後免疫拡散を行なった時にあらわれる沈降線のパターン
 (4) 尿素を含まない系での等電点電気泳動のパターン 矢印の所に細い線が数本見える。

(1)



(2)

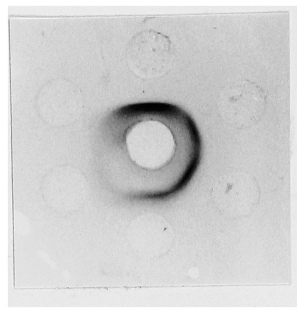


図7 抗画分I抗体に対する画分Iと画分IIの免疫拡散の沈降線のパターン

(1) 上部の穴に 0.5 mg/ml の画分I, 右まわりに倍々希釈した画分Iを注入。中央の穴に抗画分I抗体が入っている。(2) 上部の穴に 0.7 mg/ml の画分II, 右まわりに倍々希釈の画分II, 中央の穴に抗体が入っている。

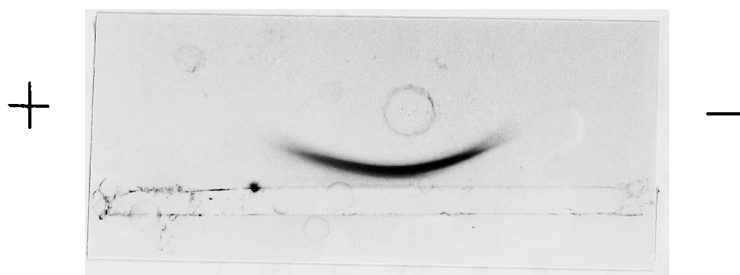


図8 抗画分I抗体に対する画分Iの免疫電気泳動による沈降線のパターン

0.8 mg/mlの画分Iが穴に，抗体が溝に入っている。

画分 I はあらかじめ 1% SDS 10 mM β メルカプトエタノール溶液で処理しておく。1本のはっきりした沈降線が形成される。(図 9(2))

電気泳動を SDS ポリアクリルアミドゲルの系で行った免疫電気泳動でも沈降線は 1本である。(図 10) アガロースゲル中に SDS は含まれていない。

等電点電気泳動を 8.5 M 尿素を含むゲルで (pH 範囲 3.5 - 10) 行くと 4本の蛋白質のバンドになるが、それに対する免疫拡散によると、4本のバンドの存在する部域に沿って平行な 5本の沈降線が形成される。(図 6(3)) このことから、これ等 4種の蛋白質は同一抗原性を有していることがわかる。

4. 蛍光抗体法で画分 I の蛋白質の存在位置を調べる

ニワトリの筋原線維を画分 I に対する抗血清を使って 間接蛍光抗体法で染色し 位相差像と 落射蛍光抗体像から、画分 I の存在

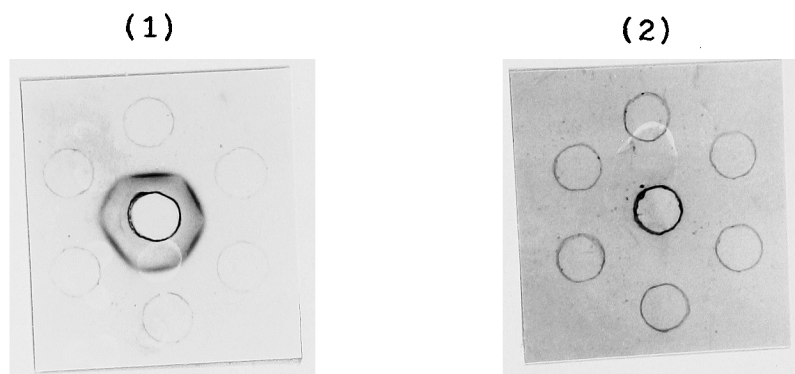


図 9 0.1% SDS と 2.0 mM β -メルカプトエタノールを含むアガロースゲル中での抗画分 I 抗体に対する画分 I (1) とデスミン (2) の免疫拡散による沈降線のパターン
 中央の穴に抗画分 I 抗体 周囲の穴には 上端の穴から順に 1% SDS にとかされた 0.4 mg/ml 画分 I 0.6 mg/ml デスミンが倍々稀釈して注入し

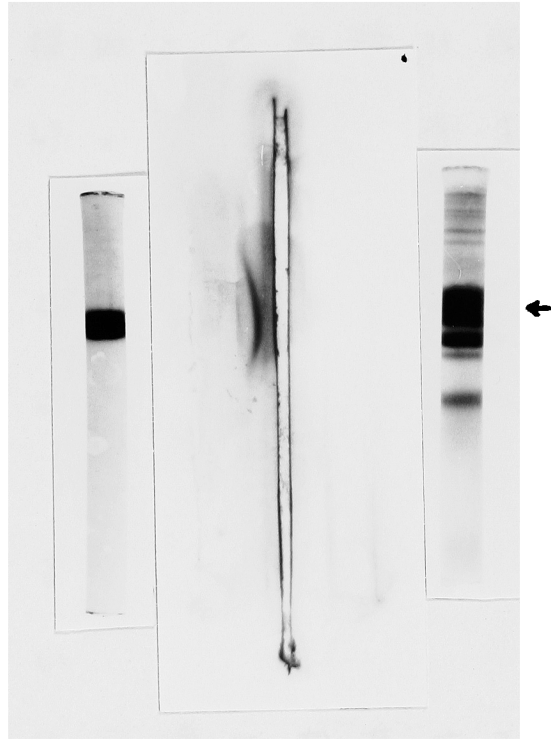


図10 画分Ⅰとデスミンの抗画分Ⅰ抗体に
 対する免疫拡散 SDS ポリアクリルアミド
 電気泳動後アガロース中に埋め免疫拡散を
 行う。 左側：画分Ⅰ 右側：デスミン（
 矢印）

位置を決定する。図11に示すように蛍光抗体は強く区膜を染めている。A帯の中央がごく弱く染められているものがある。

免疫前に採血した血清は同条件下で筋原線維を染めない。また、画分Iで吸収した血清を用いると区膜を極めて弱く染める。(図14) 直接法による染色でも同じ結果を得た。(本論文には示していない)

5 画分Iは、 α アクチニン・デスミンではない

これまで区膜に存在する調節蛋白質として α アクチニン・デスミンが報告されているが以下に画分Iがそれ等とは異なる蛋白質であることを示す。

1) 分子量による比較

図12に示す通り α アクチニンは分子量約9万位で明らかに画分Iと違っている。デスミンは分子量的には区別できない。同一ゲル中で SDS アクリルアミド電気泳動を行うと

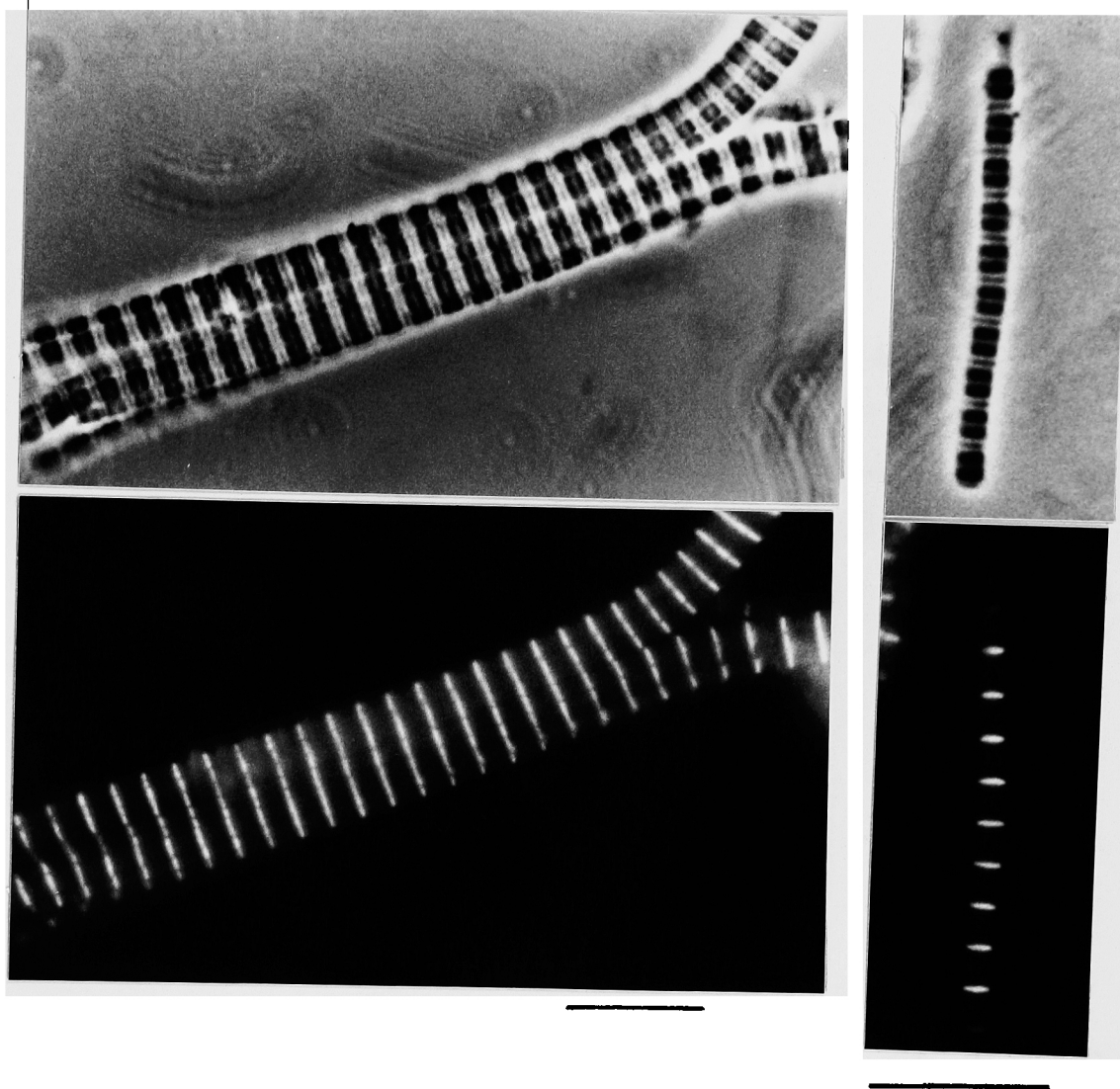


図 11 間接蛍光抗体法を用いた 抗画分 I
抗体による筋原線維の染色パターン
上: 位相差像 下: 蛍光染色像
バーは 10μ をあらわす

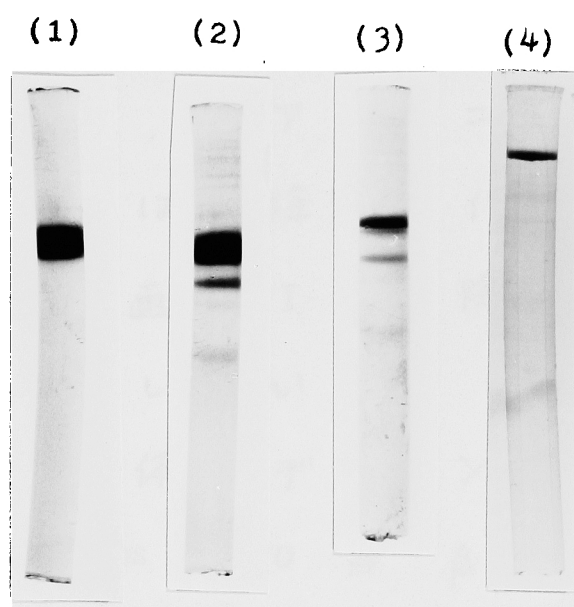


図 12. 画分 I , デスミン , α アクトニンの
ポリアクリルアミド電気泳パターンによ
る比較

(1) 画分 I , (2) 画分 I + デスミン , (3) デスミ
ン , (4) α アクトニン

ほとんど同じ位置にバンドを作ることが分かる。

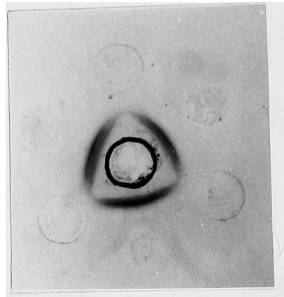
- 2) α アクチニン(図13)に対する抗体を作
って免疫的差異を示す

図13に示す通り抗 α アクチニン抗体は免疫拡散法によると、 α アクチニンと沈降線を形成し画分Iとは沈降線を作らない。一方抗画分I抗体は画分Iと沈降線を作り α アクチニンとは反応しない。

- ③ 抗画分I抗体はデスミンと反応しない。
デスミンを1% SDS 10 mM β -メルカプトエタ
ノール溶液にとかし0.1% SDS 2 mM β -メルカ
プトエタノールを含むアガロースゲル中で
抗画分I抗体に対して免疫拡散を行う。沈降
線は形成されない。(図9②) 同一条件下で
抗画分I抗体は画分Iに対して沈降線を作
っている。(図9①)

SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を
行う免疫電気泳動の結果も同様で画分Iに
対しては沈降線を作るがデスミンに対して

(1)



(2)

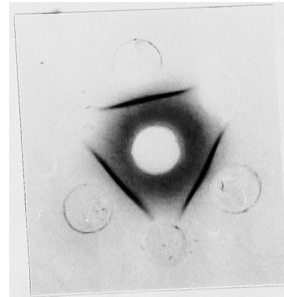


図 13 抗画分 I 抗体と抗 α マクチニンに対する、画分 I と α マクチニンの免疫拡散による沈降線のパターン

(1) 中央の穴に抗画分 I 抗体、(2) 中央の穴に抗 α マクチニン抗体がそれぞれ入っている。
最上部の穴に 0.9 mg/ml の α マクチニンが、右隣の穴に 0.8 mg/ml の画分 I、以下順に α マクチニンと画分 I が交互に入っている。

は 沈降線を作らない。(図 10)

4) 抗原 I 抗体はデスミンで吸収されない。

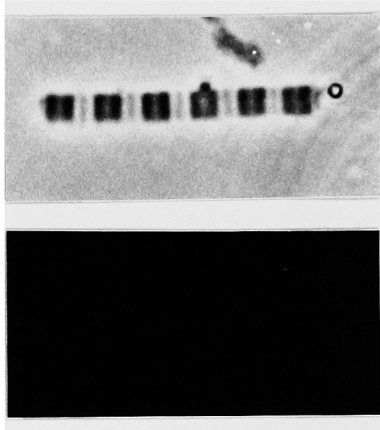
抗原 I 血清に pH 中性にして沈殿させたデスミン⁽²⁹⁾を最終濃度 1 mg/ml になる様に加え生理食塩水で 60 倍稀釈になるように合わせる。この稀釈血清を間接蛍光抗体法により筋原線維を染めるのに使用する。吸収しない血清と同様に強く呂膜を染めている。(図 14)

(2) 一方 同様の方法で吸収した血清を稀釈せずに免疫拡散に用いる 抗原 I と沈降線を形成する。

6. アクチンとの結合実験

0.7 mg/ml F アクチン, 0.02 mg/ml 抗原 I 溶液を室温で 30 分間放置してから 50,000 rpm で 1 時間超遠心する。上清と沈殿とをそれぞれ SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかける。図 15 に示すように 抗原 I はほとんど上清に存在する。沈殿はほとんどアクチンで 抗原

(1)



(2)

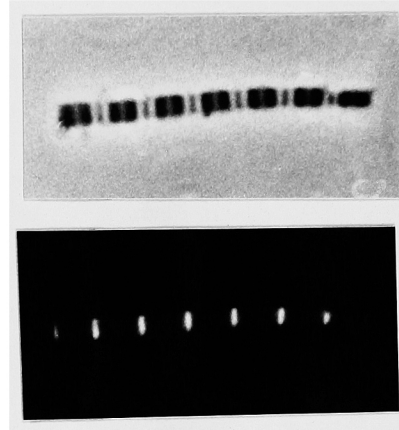


図 14 画分 I と デスミン で 吸収 した 抗 画分 I による、間接 蛍光 体法 を 用いた 筋原 線維 の 染色 パターン (1) 画分 I による 吸収 (2) デスミン による 吸収 上: 位相差 像 下: 蛍光 染色 像 バー は 10 μ を あらわす。

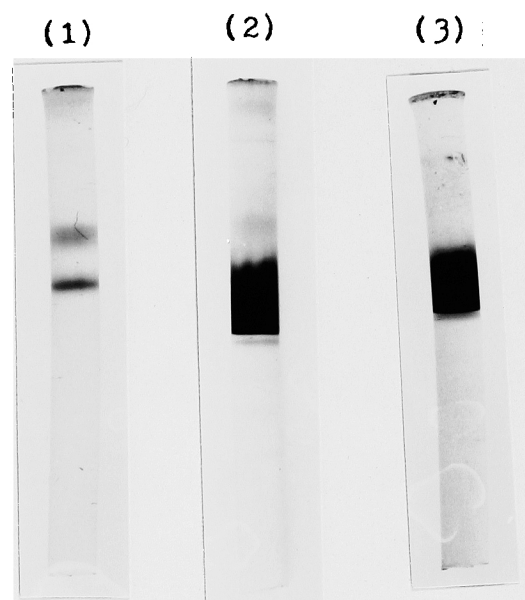


図 15 アクチンと画分 I の結合実験

(1) 超遠心後の上清 (2) 超遠心の沈殿

(3) アクチンのみ

Ⅰは 痕跡程度である。アクチンに対して
強い結合性は持っていないと思われる。

考 察

1 画分 I は ア イ ソ プ ロ テ イ ン か

画分 I は SDS ホリ ア ク リ ル ア ミ ド 電 気 泳 動
で 一 見 シ ン グ ル バ ン ド の よ う に 見 え る が、
よく 見 る と 3 本 の バ ン ド に 分 れ て い る。(図 5)
尿 素 を 含 む 等 電 点 電 気 泳 動 で は、4 本 の 濃 い バ
ン ド を 形 成 す る (図 6(4))。 こ の こ と か ら 画 分 I
は 4 種 の 蛋 白 質 群 で あ る と い え る。 免 疫 等 電
点 電 気 泳 動 の 結 果 (図 6(3)) か ら こ の 4 種 の 蛋 白
質 が 同 じ 抗 原 性 を 持 つ こ と が わ か る。 こ れ 等
は ト ロ ポ ミ オ シ ン が α' , α'' , β' , β'' の 4 種
類 の 分 子 種 か ら な っ て い る よ う に⁽³⁴⁾、 同 じ 機 能
を 持 つ 蛋 白 質 で 不 均 一 性 を 示 す も の で あ る か
も 知 れ な い。 し か し 画 分 I を 得 る の に 調
整 の 期 間 が 2 週 間 程 か か る の で こ の 間 に 分
子 が 一 部 限 定 分 解 さ れ て い る 可 能 性 も 全 く 否
定 は で き な い。 特 に 2 膜 は 蛋 白 分 解 酵 素 に 攻
撃 さ れ や す い こ と が 知 ら れ て い る。 も っ と
新 鮮 な 状 態 で、 こ の 蛋 白 質 の 存 在 を 示 す 方 法
を 考 慮 す る 必 要 が あ る。(例 え ば 二 次 元 電

気泳動で)

ス 画分 I の溶液中での存在状態

尿素の存在の有無で等電点電気泳動のパターンに違いが出ることより、溶液状態では何らかの会合体を作っていることが示唆される。免疫拡散法で SDS と β メルカプタエタロールが存在すると抗画分 I に対する沈降線は一本で SDS が存在していないと複数本になることも会合体を作ることと示唆すると思われる。(図79(1))。SDS により会合体の形成が、阻止されるのであろう。ただし、沈降線が複数本できるということは、(同一抗原性を持つ蛋白質群であるにかかわらず) 会合体を作ることによって、単一分子の時と異なる抗原性を有するようになるかと考える以外に説明することはむづかしい。免疫等電点電気泳動で平行な二本の沈降線を作る(図6(3))こともそれで説明できる。そしてこの会合体は同一分子種間でも作り得るということになる。

画分 I は画分 II と同じ抗原性を有している。

尿素を含む等電点電気泳動でもほぼ同じパターンを示す。この蛋白質群は等電点電気泳動が完了するのに長時間を要するが画分Ⅰの方が画分Ⅱよりも時間を要するようである。これ等のことよりこの新しい蛋白質群が

DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーで広い NaCl の濃度勾配にわたって溶出される(図1)のは異なる分子種が順番に出てくるのではなくて、存在様式の異なる集合体が順に出てくるためではないかと考えられる。

3 画分Ⅰは低イオン強度で冷室に保存すると沈殿を作る

画分Ⅰを凍結融解すると不溶性の沈殿を作る。超遠心で取り除き、上清を4℃で静置する。画分Ⅰは1 mM NaHCO_3 を含む溶液である。2〜3日後に沈殿が生じる。これを電子顕微鏡で観察する。(図16)不定形の集合体に混じって膜状の構造物が多く見える。(図16(1)(2)) また繊維状の細いフィラメント構造

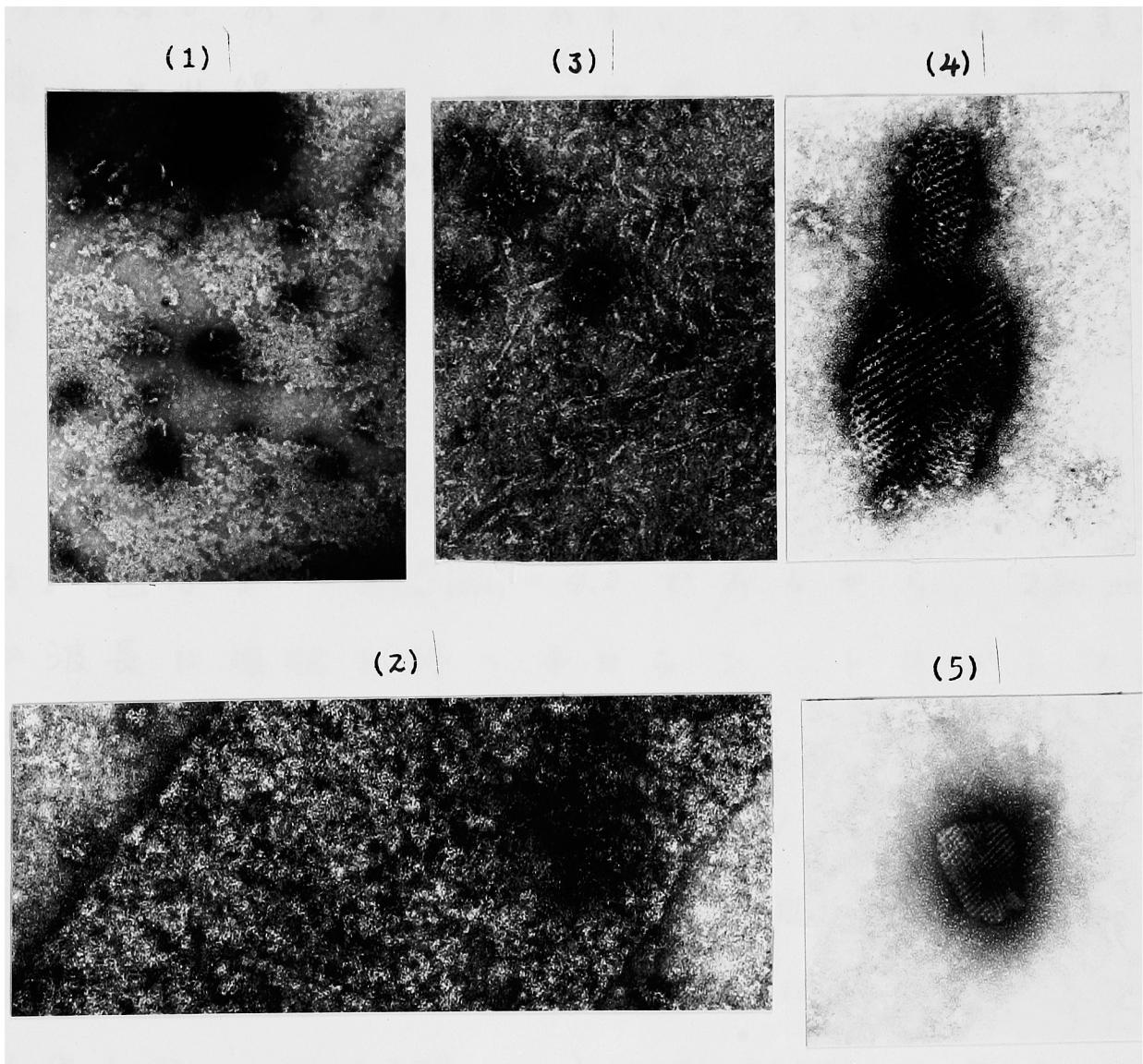


図16 画分Iの電子顕微鏡像

(1) X 38,400

(2), (3), (4), (5) X 152,000

が存在している。(図16(3))太さは30 Å以下である。また80 Å位の格子構造を持つ集合体がいしばしば観察される。格子構造のパターンは何種類かあるようである。こういった格子構造をとり得ることは、巨膜の格子との関連から考えて興味深い。(図16(4)(5))巨膜の構造について定説はないが、図16の格子と似たものも報告されている。(18)

4. 画分Iのアミノ酸組成について

多くの蛋白質は吸光係数 $E_{1\text{cm}}^{1\%}(280) = 10 \pm 5$ である。画分Iの $E_{1\text{cm}}^{1\%}(280) = 4.2$ であるから、280 nmの波長に吸収を持つチロシン トリアトファンが少ないことが予想される。

今ここで、簡単のためアミノ酸の分子量を全て130と考える。280 nm付近の分子吸光係数としてチロシン(274.5 nm)は $\epsilon = 1340$, トリアトファン(278 nm)は $\epsilon = 5550$, シスチン(280 nm)は $\epsilon = 200$ として計算する。アミノ酸組成の結果より、分子量55,000のこの蛋白質のチロシンとシスチンの個数が分かる。これ等の値に基づいてチロシンとシスチンに

る画分 I の ϵ は 21,400 と計算される。実測値から求めた ϵ は 23,000 程度であるから、トリプトファンはほとんど含まれていないという結論に達する。

5 画分 I は新しい蛋白質である。

2 膜に存在する蛋白質は 現在までに α アクチニンとデスミンと 10 S アクチニンが知られている。免疫的手法から、画分 I が α アクチニンの分解物である可能性はほとんどないことがわかる。デスミンと分子量は全く同じであるが 抗画分 I 抗体と反応しない。アミノ酸組成もかなり違っている。またデスミンは KI 溶液にとけないことによっても画分 I とは違う蛋白質であることがわかる。デスミンの等電点は pH 5.5 位で α 鎖と β 鎖からなることがわかっている⁽³⁰⁾ の点に於ても画分 I の等電点は 6~6.5 とは区別できる。

10 S アクチニンとの比較は行っていないが 10 S アクチニンの分子量は 43,000 であ

ることより 画分 I とははっきり区別ができる。

6 新しい蛋白質の存在位置について

蛍光抗体法によると 新しい蛋白質に対する抗体は区膜を染色する。またこの抗体を画分 I で吸収することにより 区膜は非常によわくしか染色されない。(図 14 (1)) ことより、新しい蛋白質は 区膜に存在することになる。

画分 I の蛋白標品の中に 微量のデスミンが含まれており、そのために免疫拡散では検出できない程度のデスミンに対する抗体が抗画分 I 抗体の中に含まれていてそれが区膜を蛍光抗体法で染める可能性がある。しかしこの可能性はデスミンで吸収した血清がやはり区膜を蛍光抗体法で染めることから否定される。

Lezerides は 隣りあった区膜同士が同調して並んでいる(図 11 参照)ことから、区膜同士

に弱い相互作用があると考え、筋原線維を、KI 溶液で処理し フレンドして Z 膜が多数集まった Z-planes を顕微鏡下で観察することに成功した。Z-planes を抗デスミン抗体 抗 α アクチニン抗体の蛍光抗体法で調べることにより、デスミンは Z 膜の周囲にあり、 α アクチニンは Z 膜の中央部のデスミンがない位置にあることがわかった。⁽⁵¹⁾ これは α アクチニンが Z 膜を補強しているとする考えと一致している。Lazarides はデスミンが T 管系を Z 膜に結合する役割を果たすのではないかと論じている。

一方、新しい Z 膜蛋白質は ガラス器内で格子構造を形成するが Z 膜の格子として報告されたもののの中にこれと似たものがある。⁽⁴⁸⁾ 新しい蛋白質は Z 膜の格子を形成するのではないかと希待される。(図 16)

7 新しい蛋白質の収量について

現在用いている調製法によると 新しい蛋白質は筋肉 1 kg から数 mg しか粗抽出の状態で得られるだけである この新しい蛋白質は

低イオン強度で長時間おくと、不溶性の沈殿を作ることがわかった。(考察3) 材料と方法および結果の項で述べた通り 低イオン強度での透析をくり返している。この結果、収量が落ちているのではないかと考えられる。調製法を改良すれば収量が増える可能性は大きい。不溶性になった沈殿を完全にとかすものとしては 現在の所、尿素溶液と SDS 溶液しかわかっていない。

酵素のなかに 筋原線維に吸着されるものがあることが報告されている。⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾ 一般にこれ等は比較的簡単な操作で筋原線維よりはすれる。新しい蛋白質の抽出には 激しい操作が必要であることより、筋原線維の構造の中に強く組み込まれているのではないかと考えられる。

以上の考察より、この分子量 55,000 の蛋白質は骨格筋の新しい調節蛋白質であろうと考えられる。in vitro での作用はわかっていない。

アクチンと強い結合はしない(図15)ようであるが調整に長時間を要するため、その間に結合能を失った可能性もあるかも知れない。

要 約

骨格筋の筋原線維のミオシンとアクチンの抽出残渣を 0.6 M KI 溶液で処理して得られる上清に分子量約 55,000 の蛋白質がある。この蛋白質は、同じ抗原性を持つ 4 種の分子からなる。4 種の分子はおおよそ pH 6.0 ~ 6.5 の間に等電点を持つ。 $E'_{1\text{cm}}(280)$ の吸光係数は約 4.2 である。アミノ酸分析の結果を考慮に入れて概算すると、トリプトファンがほとんどないことが推測できる。

この蛋白質に対する抗体で間接蛍光抗体法により、筋原線維を染めてみると、Z 膜が強く染色される。この Z 膜の蛍光染色は、抗血清をこの蛋白質で吸収することにより、極めて微弱になる。このことからこの蛋白質は Z 膜に存在することがわかる。

Z 膜に存在することが知られている調節蛋白質に、 α アクチニン、デスミン、10 S アクチニンがある。

α アクリニンとは免疫的に区別されるため、この蛋白質は α アクリニンの分解物ではないと思われる。

デスミンとは分子量の点では区別できないが、この蛋白質に対する抗体はデスミンと反応しないし、またデスミンによって吸収もされない。アミノ酸組成の点でも異っている。

10 S アクリニンは分子量が 43,000 であり明らかに異なる蛋白質である。

以上のことより、この分子量 55,000 の蛋白質は、骨格筋の新しい調節蛋白質であると考えられる。

この蛋白質はガラス器内で格子構造をとる。これがZ膜の格子構造と似ていることから、この蛋白質がZ膜の格子を作っている可能性がある。

謝 辞

本研究に際し、六年間にわたり御懇切な御指導と御助力を賜わりました千葉大学の丸山工作教授に深く感謝致します。京都大学の岡田節人教授には多岐にわたる御援助を戴きました。心より感謝致します。筑波大学の真崎知生教授には、蛍光抗体法の御教示を戴きました件深謝致します。電子顕微鏡と免疫拡散法の手ほどきをして戴きました京都大学の柳田充弘教授に深く感謝します。京都大学の宝谷紘一 助手 には暗視野顕微鏡の使用法等につき御教授戴きました。深く感謝します。木村澄子氏には六年間に渡り御援助をいただきましたことを深く感謝します。

参考文献

1. H. E. Huxley & J. Hanson: Quantitative studies on the structure of cross-striated myofibrils I. Investigations by interference microscopy
Biochim. Biophys. Acta 23 229-249 (1957)
2. J. Hanson & H. E. Huxley: Quantitative studies on the structure of cross-striated myofibrils II. Investigations by biochemical technique
Biochim. Biophys. Acta 23 250-260 (1957)
3. H. E. Huxley & J. Hanson; Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation
Nature 173 973-976 (1954)
4. A. F. Huxley: Muscle structure and theories of contraction
Progr. Biophys. 7 255-318 (1957)
5. S. Ebashi & M. Endo: Ca ion and muscle contraction
Quart. Rev. Biophys. 2 351-384 (1968)
6. S. Ebashi, A. Kodama & F. Ebashi: Troponin I. Preparation and physical function
J. Biochem. 64 465-467 (1968)
7. K. Maruyama, S. Matsubara, R. Natori, Y. nonomura, S. Kimura K. Ohashi, F. Murakami, S. Handa & G. Eguchi: Connectin, an elastic protein of muscle
J. Biochem. 82 317-337 (1977)

8. T. Masaki & O. Takaiti: M-Protein
J. Biochem. 75 367-388 (1974)
9. G. Offer: C-Protein and the periodicity in the thick
filaments of vertebrate skeletal muscle
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37 87-93 (1972)
10. K. Ohashi, S. Kimura, K. Deguchi & K. Maruyama: I-Protein,
a new regulatory protein from vertebrate skeletal muscle
I. Purification and characterization
J. Biochem. 81 233-236 (1977)
11. K. Ohashi, T. Masaki, and K. Maruyama: I-Protein, a new
regulatory protein from vertebrate skeletal muscle
II. Localization
J. Biochem. 81 237-242 (1977)
12. K. Maruyama, S. Kunitomo, S. Kimura & K. Ohashi: I-Protein
a new regulatory protein from vertebrate skeletal muscle
III. Function
J. Biochem. 81 243-247 (1977)
13. K. Maruyama: Some physico-chemical properties of β -actinin,
"actin-factor", isolated from striated muscle
Biochim. Biophys. Acta 102 542-548 (1965)
14. K. Maruyama, S. Kimura, T. Ishii, M. Kuroda, K. Ohashi &
S. Muramatsu: β -Actinin, a regulatory protein of muscle
J. Biochem. 81 215-232 (1977)
15. M. Kuroda & K. Maruyama: γ -Actinin, a new regulatory protein
of skeletal muscle I. Purification and characterization
J. Biochem. 80 315-322 (1976)

16. M. Kuroda & K. Maruyama: γ -Actinin, a new regulatory protein
of skeletal muscle II. Function
J. Biochem. 80 323-332 (1976)
17. G. G. Knappeis & F. Carlsen: The ultrastructure of the
Z disc in skeletal muscle
J. Cell Biol. 13 323-335 (1962)
18. W. C. Ullrick, P. A. Toselli, J. D. Saide & W. P. C. Phear
Fine structure of the vertebrate Z-DISC
J. Mol. Biol. 115 61-74 (1977)
19. D. E. Kelly: Models of Muscle Z-band fine structure based
on looping filament configuration
J. Cell Biol. 13 827-840 (1967)
20. R. W. D. Rowe: The ultrastructure of Z-discs from white,
intermediate, and red fibers of mammalian striated muscles
J. Cell Biol. 57 261-277 (1973)
21. S. Ebashi & F. Ebashi: α -Actinin, a new structural
protein from striated muscle I. Preparation and action
on actomyosin ATP interaction
J. Biochem. 58 7-12 (1965)
22. T. Masaki, M. Endo & S. Ebashi: Localization of 6 S
component of actinin at Z-band
J. Biochem. 63 630-632 (1967)

23. H. Sugita, T. Masaki & S. Ebashi: Staining of myofibrils with fluorescent antibody against the 10 S component of the original α -actinin preparation
J. Biochem. 75 671- 673 (1974)
24. M. Kuroda & T. Masaki: 10-S actinin, a new structural protein from muscle
Sixth International Biophysics Congress Kyoto (1978)
25. T. Wallimann, H.J. Kuhn, G. Pelloni, D.C. Turner & H. M. Eppenberger: Localization of creatin kinase isoenzymes in myofibrils II. Chicken heart muscle
J. Cell Biol. 75 318-325 (1977)
26. K. Morimoto & W. F. Harrington: Isolation and physical properties of an M-line protein from skeletal muscle
J. Biol. Chem. 247 3052-3061 (1972)
27. T. Wallimann, D.C. Turner & H. M. Eppenberger: Localization of creatine kinase isoenzyme in myofibrils I. Chicken skeletal muscle
J. Cell Biol. 75 297-317 (1977)
28. E. Lazarides & B. D. Hubbard: Immunological characterization of the subunit of the 100 A filament from muscle cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 4344-4348 (1976)

29. J. V. Small & A. Sobieszek: Studies on the function and composition of the 10-NM filaments of vertebrate smooth muscle
J. Cell Sci. 23 243-268 (1977)
30. J. G. Izant, & E. Lazarides: Invariance and heterogeneity in the major structural and regulatory proteins of chick muscle cells revealed by two dimensional gel electrophoresis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 1450-1454 (1977)
31. E. Lazarides & B. L. Granger: Fluorescent localization of membrane sites in glycerinated chicken skeletal muscle fibers and the relationship of these sites to the protein composition of the Z disc
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 3683-3687 (1978)
32. K. Weber & M. Osborn: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis
J. Biol. Chem. 244 4406-4412 (1969)
33. P. H. O'Farrell: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins
J. Biol. Chem. 250 4007-40 (1975)
34. P. Commins & V. Perry: Chemical and immunolchemical characterization of tropomyosin from striated and smooth muscle
Biochem. J. 141 43-49 (1974)

35. H. Arnold & D. Pette: Binding of aldolase and triosephosphate dehydrogenase to F-actin and modification of catalytic properties of aldolase
Eur. J. Biochem. 15 360-366 (1970)
36. H. Eppenberger & C. W. Heizmann: Localization of 3 enzymes in the M-line of myofibrils
J. Cell Biol. 70 212a (Abstr.) (1976)